

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09274

研究課題名(和文) IgA腎症の病態におけるTLR/BAFF/APRILの役割の解明

研究課題名(英文) Role of TLR/BAFF/APRIL in the pathogenesis of IgA nephropathy

研究代表者

鈴木 仁 (Suzuki, Hitoshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10468572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：外来抗原TLR9の活性化により、メサングウムへのIgA、IgG、C3沈着を伴った腎組織障害が誘導される。血清糖鎖異常IgA、IgG-IgA免疫複合体、BAFF/APRILの有意な増加を認め、さらに、血清APRILは糖鎖異常IgAおよびIgG-IgA免疫複合体と有意に相関した。また、TLR9の活性化により脾細胞IL-6産生およびAPRIL発現が亢進し、IL-6、APRILの刺激により糖鎖異常IgAの産生が亢進することが確認された。以上より、IgA腎症において、TLR9活性化によりIL-6およびBAFF/APRIL産生亢進が誘導され、腎炎惹起性免疫複合体形成が亢進されると考えられる。

研究成果の概要(英文)：TLR9 activation induced mesangioproliferative glomerulonephritis accompanied by mesangial deposition of IgA, and C3. Serum levels of Gd-IgA, IgG-IgA immune complexes and APRIL are overproduced by TLR9 activation. Serum levels of APRIL significantly correlated with serum level of Gd-IgA and IgG-IgA immune complexes. The activation of TLR9 induced production of IL-6, and IL-6 stimulation induced overexpression of APRIL in splenocytes. In IgA nephropathy, TLR9 activation enhanced Gd-IgA1 production through overexpression of IL-6 and APRIL.

研究分野：IgA腎症

キーワード：IgA腎症 糖鎖異常IgA1 免疫複合体 TLR APRIL BAFF

1. 研究開始当初の背景

- (1) IgA 腎症は、IgA1 を含む免疫複合体の糸球体メサンギウム領域への沈着を特徴とする。これまでの研究により、本症患者の腎糸球体に沈着する IgA1 は、IgA1 ヒンジ部の O-結合型糖鎖不全を呈した、いわゆる糖鎖異常 IgA1 (Gd-IgA1) が主体であり (Hiki Y: *Kidney Int*, 2001, Alice AC: *Kidney Int*, 2001) 血中に Gd-IgA1 が増加していることが明らかとなった (Moldoveanu Z: *Kidney Int*, 2007)。Gd-IgA1 が抗原として認識され、IgA や IgG と高分子の免疫複合体を形成することにより、肝臓でのクリアランスが遷延し、糸球体に沈着することが示唆されている (図 1) (Tomana M: *J Clin Invest*, 1999, Suzuki H: *J Am Soc Nephrol*, 2011)。実際、*in vitro* では多量体 IgA1 や IgA1-IgG 免疫複合体がメサンギウム細胞の増殖に関与していること (Novak J: *Kidney Int*, 2005) そして、多量体 IgA がメサンギウム領域に沈着し、組織障害性のサイトカインを産生することで、腎炎の発症および増悪を惹起する可能性が示唆されている (Gomez-Guerrero C: *J Immunol*, 1994, Lai KN: *Nephrol Dial Transplant*, 2009)。
- (2) Gd-IgA1 産生には、ガラクトース (Gal) を N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) に結合する糖鎖修飾酵素である 1.3-ガラクトース転移酵素 (C1GalT1) の活性低下、シアル酸を GalNAc に結合する 2.6-シアル酸転移酵素 (ST6GalNAcII) の活性亢進が関与し、これらの糖鎖修飾転移酵素の発現異常により Gd-IgA1 の産生を促すことが明らかとなった (図 2) (Suzuki H: *J Clin Invest*, 2008)。この糖鎖修飾酵素の発現異常は、IL-6 や IL-4 によって誘導されるので上気道炎や扁桃炎などの粘膜感染との関連が示唆される (Suzuki H: *J Biol Chem*, 2014)。
- (3) 扁桃炎や上気道感染で IgA 腎症患者の尿所見異常が増悪することや、扁桃摘出術にステロイド療法を組み合わせた治療法の有効性が報告されている (Hotta O: *Am J Kidney Dis*, 2001) ことから、IgA 腎症は扁桃を主体とした粘膜免疫応答の異常が関与すると考えられている。IgA 腎症モデルマウスにおいて脾臓での TLR9 および MyD88 の発現が亢進しており、TLR9 のリガンドである CpG-ODN を鼻腔投与すると IgA および IgA-IgG 免疫複合体の増加、腎症の増悪が認められた (Suzuki H: *J Am Soc Nephrol*, 2008)。IgA 腎症患者では、TLR9 遺伝子多型と腎症進展との有意な相関が示唆されている (Suzuki H: *J Am Soc Nephrol*, 2008)。
- (4) IgA 腎症患者での扁桃摘出の有効性

が指摘されているが、本治療の科学的根拠や適応基準については明らかではない。扁桃における TLR9 の発現量が上昇しているほど扁桃摘出術後の尿所見異常の寛解率が高く、血清 IgA の減少率が大きいことから、扁桃の病巣感染症の重要性が示唆される (Sato D: *Nephrol Dial Transplant*, 2011)。我々の基礎研究により、本治療が有効であった症例では、血中糖鎖異常 IgA1 (Gd-IgA1) ・ Gd-IgA1 免疫複合体の低下が示されている (Suzuki Y: *Clin Exp Nephrol*, 2014)。

- (5) TLR7 と TLR9 は特に形質細胞様樹状細胞に発現しており、通常、粘膜免疫では制御蛋白の一つである Unc93 homolog B1 によって TLR9 応答が優位に保たれるように制御されているが、TLR9 よりも TLR7 の応答性が亢進すると自己抗体および炎症性サイトカインの産生が上昇し、自己免疫疾患が増悪することが報告されている (Fukui R: *Immunity*, 2011)。我々の予備実験では、IgA 腎症モデルにおいて TLR7 の活性化により血清 IgA ・ IgA-IgG 免疫複合体が増加することから、IgA 腎症においても TLR7/TLR9 の応答制御異常が関与していることが示唆される。
- (6) Gd-IgA1 ・ Gd-IgA1 特異的抗体の産生に B cell activating factor (BAFF) および a proliferation-inducing ligand (APRIL) の関与が示唆される: IgA 腎症患者および健常者の扁桃細胞を TLR9 のリガンドである CpG ODN で刺激すると、患者群において有意に BAFF と IgA の産生亢進が認められた (Goto T: *Clin Immunol*, 2008)。また、BAFF と同様に B 細胞の増殖因子である APRIL が IgA 腎症患者の血清で上昇している (McCarthy DD: *J Clin Invest*, 2011)。TLRs のアダプター分子である MyD88 の活性化により APRIL の発現が上昇することや (Bing He: *Immunity*, 2007) TLR7 や TLR9 の刺激により BAFF/APRIL の受容体である TAC1 の発現が増強することが報告されており (Bing He: *Nat Immunol*, 2010) IgA 腎症において IgA 産生亢進に BAFF および APRIL の関与が示唆されているが、TLR と BAFF/APRIL の関連、Gd-IgA1 および Gd-IgA1 特異的抗体の産生系への関与については明らかになっていない。

2. 研究の目的

IgA 腎症は世界で最も頻度が高い原発性糸球体腎炎であり、有効な治療法は確立されておらず予後不良である。IgA 腎症の病態には糖鎖異常 IgA1 と糖鎖異常 IgA1 免疫複合体が深く関与していると考えられ、扁桃炎などの感染を契機に増悪・進展する。本症は扁桃粘膜免疫の応答異常が関与しており、なかでも Toll like receptors (TLRs)

が本症の進展に深く関与すると考えられている。さらに、B cell activating factor (BAFF) や a proliferation-inducing ligand (APRIL) により IgA 産生が亢進することが示唆されている。本研究では、TLRs の応答制御異常による BAFF/APRIL 活性化を介した糖鎖異常 IgA1 免疫複合体形成機序を解明することを目的とする。本研究は、疾患活動性の評価および治療開発に必要不可欠であり、患者の予後を改善し透析導入を抑制するなど、医療費の削減を目指すうえで極めて重要である。

3. 研究の方法

(1) IgA 腎症の病態における TLR7 と TLR9 の応答制御異常の解明:

ループモデルにおいて、TLR9 をノックダウンさせることで TLR7 の発現が亢進し、炎症性サイトカインや自己免疫抗体産生の亢進が誘導され、糸球体腎炎の増悪を認めることが報告されている (Sean R: *Immunity*, 2006)。IgA 腎症の自然発症モデルマウスである ddY マウスは、早期発症群、晩期発症群と非発症群の 3 群に分けられる (Suzuki H: *J Am Soc Nephrol*, 2005)。各群において、脾細胞における TLR7 と TLR9 の発現バランスを RealTime PCR で解析することで、腎炎発症の有無、腎炎の重症度に、TLR7 と TLR9 の活性化と相補的制御が関与するかを解析する。

続いて、ddY 早期発症群と非発症群それぞれに対し、TLRs アンタゴニスト (Immunoregulatory sequences: IRS) の投与 (Pawar RD: *J Am Soc Nephrol*, 2007) あるいは TLR7/TLR9 のリガンドである Imiquimod/CpG-ODN を 12 週投与する (i.p.) ことで、下記 I, II に示すように TLR7/TLR9 の相補的制御異常を惹起し、腎炎の発症、および進展を検証する。さらにマウス IgA の糖鎖修飾異常の誘導と IgA 免疫複合体量の増加を解析する。

I: Imiquimod + IRS-9 (TLR7 dominant)
II: CpG-ODN + IRS-7 (TLR9 dominant)

腎炎についての評価は、尿中アルブミン定量と尿潜血反応 (2 週毎) 上記 I, II 投与前後に経時的腎生検を施行し (Suzuki H: *J Am Soc Nephrol*, 2005)、光学顕微鏡、免疫染色 (IgA, IgG, C3)、電子顕微鏡で評価する。

血清 IgA, IgG, IgA-IgG 免疫複合体を 4 週毎に測定する。マウス IgA の糖鎖修飾異常は、我々がこれまでに報告した方法 (RCA-1 および SNA レクチン) で評価する (Hashimoto A: *Am J Pathol*, 2012)。

(2) TLR7/TLR9 の刺激を介した BAFF・APRIL・TACI の発現亢進が、Gd-IgA1 および Gd-IgA1 特異的抗体の産生に及ぼす影響の解明

ヒト由来の IgA1-, IgG 産生細胞での検証

TLRs の活性化により BAFF・APRIL の産生が誘導されることが報告されている (Bing He: *Immunity*, 2007)。また、BAFF・APRIL の受容体の一つである TACI に関しても、TLRs の活性化で TACI の発現が上昇し、B 細胞のクラススイッチが誘導され IgG および IgA 抗体産生が亢進する (Bing He: *Nat Immunol*, 2010)。

この知見をふまえ、IgA 腎症患者および健常者の末梢血より樹立した IgA1 および IgG 産生細胞株 (Suzuki H: *J Clin Invest*, 2008, 2009) を用いて、IgA 腎症患者と健常人における TLR7 と TLR9 の発現バランスおよび、BAFF・APRIL・TACI の発現の相違を RealTime PCR で解析する。

続いて、TLR7 のリガンドである Imiquimod あるいは、TLR9 のリガンドである CpG-ODN で刺激し、各 TLRs を介するシグナルによる BAFF・APRIL・TACI の発現亢進の程度を評価し、C1GalT1 や ST6GalNAcII といった Gd-IgA1 の特異的糖鎖修飾酵素の活性異常を誘導できるのか、また Gd-IgA1 および Gd-IgA1 特異的抗体の産生が亢進するのか下記 ~ の方法で検証する。Imiquimod 単独、CpG-ODN 単独、Imiquimod + IRS-9、CpG-ODN + IRS-7。

次に、IgA 腎症患者由来の IgA1 および IgG 産生細胞株に対し、IRS7 による TLR7 の抑制と IRS9 による TLR9 の抑制による、BAFF・APRIL・TACI の発現低下と、Gd-IgA1 の特異的糖鎖修飾酵素の活性異常の変化、Gd-IgA1 および Gd-IgA1 特異的抗体の産生の変化を解析し、TLR7 と TLR9 の応答制御異常と BAFF・APRIL・TACI の発現との関連性、Gd-IgA1 および Gd-IgA1 特異的抗体産生との関連を解明する。

ヒト扁桃細胞における検証

IgA 腎症患者および習慣性扁桃炎患者から摘出された扁桃細胞を用いて、TLR7/TLR9 の相補的制御異常や BAFF・APRIL・TACI の発現レベルの相違を解析する。次に扁桃細胞を 72 時間培養し、培養上清中の Gd-IgA1 および Gd-IgA1 特異的抗体を測定する。さらに、IgA 腎症患者を対象に、摘出扁桃細胞における TLR7/TLR9 の発現バランス異常や BAFF・APRIL・TACI の発現量、Gd-IgA1 や Gd-IgA1 特異的抗体の産生を評価し、臨床経過との関連を解析することで、扁桃摘出の科学的根拠を示し、扁桃摘出の適応を明確にすることができると考える。

(3) TLRs・BAFF・APRIL・TACI を標的とした新規治療法の検討

前述の解析にて、Gd-IgA1、Gd-IgA1 特異的抗体の産生亢進に関わる主要な分子を同定し、中和抗体と siRNA を用いて、

IgA-、および IgG 産生細胞株における Gd-IgA 1 および Gd-IgA1 特異的抗体産生の抑制効果を検証する。

4. 研究成果

- (1) IgA 腎症の発症と進展における TLR7 と TLR9 の応答制御異常について、IgA 腎症モデルである ddY マウスを用いて解析した。TLR7 および TLR9 のリガンドをマウスに連続投与し、腎炎の重症度を検証したところ、TLR7 と比較し、TLR9 の刺激が誘導されたほうが、腎炎の重症度が高いことが明らかとなった。さらに、TLR9 活性化により血清 IgA、IgA-IgG 免疫複合体の産生量が増加し、糖鎖異常 IgA の産生亢進が誘導された。一方で、IgA 腎症を発症している個体に、TLR7 および TLR9 の inhibitor を投与したところ、TLR7 の抑制では、IgA の沈着は抑えられたものの、IgG の沈着は残存した。しかし、TLR9 を抑制することで、糸球体 IgA、IgG 沈着のいずれも軽減させることができ、血清 IgA、IgA-IgG 免疫複合体、糖鎖異常 IgA の産生を抑制することができた。
- (2) TLR9 の活性化と腎炎惹起性 IgA の産生のメカニズムについて検証を行った。TLR9 の活性化を誘導することで、脾臓における BAFF の発現上昇が確認された。BAFF の発現量の亢進と糖鎖異常 IgA 産生および IgA-IgG 免疫複合体の形成が相関することが確認された。APRIL の発現に関しては、BAFF ほど著明な増加がみられなかったが、レセプターである TACI の発現亢進は認められた。
- (3) BAFF と APRIL の発現亢進について、さらなる解析を行ったところ、BAFF よりも APRIL の発現亢進と糖鎖異常 IgA 産生および IgA-IgG 免疫複合体の形成が相関することが確認された。TLR9 の活性化と APRIL の発現亢進をつなぐ機序は不明であったが、我々が近年報告している糖鎖異常 IgA の産生誘導を引き起こす IL-6 に着目した。TLR9 の活性化が IL-6 を誘導し、IL-6 の発現亢進に伴い APRIL が誘導されることが明らかとなった。
- (4) ヒトでも同じ現象が誘導されるのかを確認するために、ヒト IgA1 産生細胞株を用いた検証を行った。CpG-ODN を用いて TLR9 の活性化を誘導することで、IL-6 の発現が亢進し、APRIL の産生が増加することが確認された。その結果として、糖鎖異常 IgA1 の産生亢進が認められた。
- (5) IgA 腎症において、TLR9 活性化により IL-6 および BAFF/APRIL 産生亢進が誘導され、腎炎惹起性免疫複合体形成が亢進されると考えられる。BAFF と APRIL のどちらがより病態の key になっているのか、治療効果、安全性など今後検証を

すすめていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

1. Yasutake J, Suzuki Y, Suzuki H, Hiura N, Yanagawa H, Makita Y, Kaneko E, Tomino Y. Novel lectin-independent approach to detect galactose-deficient IgA1 in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 30: 1315-21, 2015 doi: 10.1093/ndt/gfv221. 査読有
2. Huang ZQ, Raska M, Stewart TJ, Reily C, King RG, Crossman DK, Crowley MR, Hargett A, Zhang Z, Suzuki H, Hall S, Wyatt RJ, Julian BA, Renfrow MB, Gharavi AG, Novak J. Somatic Mutations Modulate Autoantibodies against Galactose-Deficient IgA1 in IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 27: 3278-3284, 2016 doi: 10.1681/ASN.2014101044. 査読有
3. Suzuki H, Allegri L, Suzuki Y, Hall S, Moldoveanu Z, Wyatt RJ, Novak J, Julian BA. Galactose-Deficient IgA1 as a Candidate Urinary Polypeptide Marker of IgA Nephropathy? *Dis Markers* 2016. doi: 10.1155/2016/7806438. 査読有
4. Muto M, Manfroi B, Suzuki H, Joh K, Nagai M, Wakai S, Righini C, Maiguma M, Izui S, Tomino Y, Huard B, Suzuki Y. Toll-Like Receptor 9 Stimulation Induces Aberrant Expression of a Proliferation-Inducing Ligand by Tonsillar Germinal Center B Cells in IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 28: 1227-1238, 2017 doi: 10.1681/ASN.2016050496. 査読有

5. Placzek W, Yanagawa H, Makita Y, Renfrow MB, Julian BA, Rizk DV, Suzuki Y, Novak J, Suzuki H: Serum galactose-deficient-IgA1 and IgG autoantibodies correlate in patients with IgA nephropathy. *Plos One* 11: e0190967, 2018. doi: 10.1371/journal.pone.01909672018.
査読有

[学会発表](計 15件)

TLR9 activation aggravates murine IgA nephropathy; possible role of BAFF mediated pathway. The ASN (American Society of Nephrology) 48th Annual Meeting, San-Diego, USA, 2015

Glomerular galactose-deficient IgA1 is specific for IgA nephropathy. 53rd ERA-EDTA, VIENNA, May 21, 2016

Galactose-deficient IgA1 as a urinary polypeptide biomarker of IgA nephropathy. 14th International Symposium on IgA Nephropathy, Tours, France, Sep 15-17, 2016

TLR9 activation induced overproduction of aberrantly glycosylated IgA via activation of BAFF in patients with IgA nephropathy. The ASN (American Society of Nephrology) 49th Annual Meeting, Chicago, USA, Nov 18, 2016

Immune-complexes formation depends on apoptosis inhibitor of macrophage in IgA nephropathy. 54rd ERA-EDTA, Madrid, June 4, 2017

TLR9 activation induces overproduction of aberrantly glycosylated IgA through APRIL mediated pathway in IgA nephropathy. The ASN (American Society of

Nephrology) 50th Annual Meeting, New Orleans, USA, Nov 2-5, 2017

Dysregulation of mucosal immune response in IgA nephropathy. ISN FRONTIERS meeting, Tokyo, Feb, 23-25 2018

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 仁 (SUZUKI, Hitoshi)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号: 10468572

(2)研究協力者

鈴木祐介 (SUZUKI, Yusuke)
牧田侑子 (MAKITA, Yuko)